

Identifikasi dan Karakterisasi Polimorfisme Gen Hormon Pertumbuhan pada Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi Benggala

Identification and characterisation of the polymorphic growth hormone gene of the Bali cattle, the Madura cattle and Ongole cattle

SUTARNO¹, ARIS JUNAI², AGUS PURWOKO¹, NEO INDRA LELANA¹

¹Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta 57126

²Fakultas Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta 55281

Diterima: 26 Nopember 2001. Disetujui: 4 Januari 2002

ABSTRACT

A total of 150 cattle consisting of 3 breeds (Bali, Madura and Ongole) of Indonesian native cattle were used in this study. The aims of the study were to identify and characterize polymorphisms in the growth hormone loci of those breeds of cattle. The genomic DNA was extracted using Wizard genomic DNA purification system from Promega. Two fragments of growth hormone gene were amplified using PCR and continued with RFLP using restriction enzymes of *AclI* and *MspI*. Polymorphisms were found at both loci of GH-L1 and GH-L2 of the growth hormone gene by PCR-RFLP analysis in all breeds of those cattle.

© 2002 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Keywords: PCR-RFLP, growth hormone gene, polymorphism, Indonesian local cattle.

PENDAHULUAN

Diversitas genetik pada sapi, dan juga pada hewan-hewan ternak lainnya mengalami penurunan sangat cepat (Hall & Bradley, 1995; Hammond & Leitch, 1995). Pemilihan suatu jenis sapi tertentu karena pertimbangan-pertimbangan keunggulan ekonomis dalam hal produksi telah menurunkan diversitas genetik, dan bahkan menjadi salah satu mekanisme utama yang sangat potensial menurunkan diversitas genetik.

Diversitas genetik merupakan dasar perkawinan silang bagi hewan ternak (Buis *et al*, 1994) karena informasi ini dapat digunakan sebagai titik awal untuk meningkatkan kuantitas dan kualitas jenis melalui seleksi buatan. Pengetahuan mengenai pola-pola variabilitas genetik dari masing-masing jenis akan membantu pengembangan program persilangan, dan merupakan pengetahuan

awal yang diperlukan dalam konservasi sumber genetik (Kidd *et al*, 1974). Dengan demikian maka informasi tentang diversitas genetik dan kekerabatan genetik pada hewan ternak termasuk sapi adalah sangat penting dalam usaha mengembang-biakkan sapi untuk memperoleh bibit unggul.

DNA marker, yang diperoleh dengan menggunakan teknik deteksi berdasarkan PCR telah banyak ditemukan, baik dari DNA inti maupun DNA sitoplasma. Penemuan-penemuan ini sebenarnya dimulai dari adanya konsep diversitas genetik yang pada awalnya hanya didasarkan pada keanekaragaman morfologi. Dengan kemajuan di bidang biomolekuler, maka keanekaragaman morfologi dapat dicari langsung penyebabnya pada level gen, materi yang bertanggung jawab terhadap terjadinya variasi morfologi. Namun demikian, belum semua variasi morfologi dapat diketahui penyebabnya,

karena tidak semua sifat yang tampak dikodekan oleh gen tunggal. Pada umumnya sifat yang memiliki nilai ekonomi tinggi dikodekan oleh banyak gen, yang dikenal dengan istilah *polygenic traits*, dengan demikian tidaklah mudah untuk memperoleh gen yang bertanggung jawab terhadap sifat semacam ini.

Variasi DNA pada lokus gen hormon pertumbuhan banyak dipelajari akhir-akhir ini. Dengan kemajuan teknik molekuler, variasi gen hormon pertumbuhan dapat dideteksi secara lebih cepat dan akurat. Variasi pada gen ini akan mempengaruhi produk yang berupa hormon pertumbuhan. Pengaruh variasi ini dapat bersifat positif dan negatif, hormon pertumbuhan yang dihasilkan mungkin juga dapat defektif. Banyaknya minat untuk mempelajari variasi pada gen ini mungkin disebabkan karena produk gen ini sangat berpengaruh pada sifat-sifat yang memiliki nilai ekonomi penting. Hormon pertumbuhan mempunyai pengaruh utama pada pertumbuhan, laktasi dan perkembangan kelenjar susu (Cunningham, 1994; Hoj *et al*, 1993a).

Dari uraian di atas maka permasalahan yang diangkat dalam penelitian awal ini adalah: adakah variasi genetik (polimorfisme) pada gen hormon pertumbuhan pada sapi pedaging lokal Indonesia (sapi Madura, Benggala dan Bali).

BAHAN DAN METODE

Sapi percobaan

Tiga jenis sapi digunakan dalam penelitian ini, yaitu sapi Bali, sapi Madura dan sapi Ongole (Benggala). Sampel sapi Bali diambil dari Lombok, sampel sapi Madura diambil dari Madura dan sapi Benggala diambil di Surakarta.

Pengambilan sampel darah

Sampel darah diambil dari 150 individu sapi dari masing-masing jenis tersebut di atas secara *venepuncture*, menggunakan *venoject*. Darah yang diperoleh dimasukkan ke dalam 50 mL tabung reaksi yang telah diisi heparin sebagai antikoagulon. Sebanyak 10 mL darah ini diambil dan disimpan pada suhu -70°C untuk referensi dikemudian hari, sedangkan sisanya digunakan langsung dalam penelitian untuk diekstrak sel darah putihnya.

Pemisahan sel darah putih dari sampel darah

Sel darah putih diekstrak menggunakan teknik Buffy coat. Total darah dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1500 g selama 15-20 menit. Buffy coat yang diperoleh kemudian diambil dengan pipet, dipindahkan ke dalam tabung sentrifus 20 mL, dipenuhi dengan larutan buffer TE1, dan disentrifugasi lagi pada kecepatan 2000 g selama 10-15 menit. Pelet yang diperoleh kemudian diresuspensikan dalam 1 mL bufer TE2, dan dipindahkan ke dalam tabung penyimpan (Nunc) untuk disimpan pada suhu -80°C sampai saat digunakan untuk proses selanjutnya.

Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi dari sel darah putih dengan menggunakan teknik Wizard Genomic Purification System (Promega, Madison USA).

Amplifikasi gen hormon pertumbuhan

DNA yang diperoleh langsung digunakan untuk reaksi PCR yang dilakukan dalam mesin PCR (Perkin Elmer 2400/ 9700). Dua fragmen gen hormon pertumbuhan, lokus 1 dan lokus 2 diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer berturut-turut GH1/GH2 dan GH5/GH6. Semua reaksi amplifikasi dilakukan dalam volume 25 μL campuran reaksi yang terdiri dari: 200 ng DNA template, 0.15 μM dari masing-masing oligonukleotida primer, 200 μM dari masing-masing dNTPs, 2 mM MgCl_2 , 10x bufer dan 1,5 unit Taq DNA polymerase dalam 0,6 mL tabung effendorf.

Kondisi reaksi amplifikasi PCR untuk gen hormon pertumbuhan adalah sebagai berikut: satu tahap reaksi denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, diikuti dengan 30 siklus amplifikasi yang masing-masing siklus terdiri dari: denaturasi pada suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 45 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit; diikuti dengan satu tahap polimerasi final pada suhu 72°C selama 5 menit.

RFLP analisis

Hasil amplifikasi PCR digunakan dalam reaksi digesti dengan menggunakan enzim *AluI* untuk mengidentifikasi situs polimorfisme *AluI* pada lokus 1, sedangkan lokus 2 didigesti menggunakan enzim *MspI*. Hasil digesti kemudian dielektroforesis pada bak elektroforesis horizontal dengan mengguna-

kan gel yang terbuat dari 1-2% agarose dalam bufer TAE. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel horisontal selama 90 menit pada 55 volt. Lama waktu sangat tergantung pada konsentrasi gel dan voltase. Agar hasil elektroforesis dapat divisualisasi, ethidium bromida disertakan pada saat pembuatan gel dengan konsentrasi final 0,12 µg/mL. Setelah elektroforesis selesai, DNA divisualisasi di bawah sinar ultra violet dalam ruang gelap, dan diambil gambarnya menggunakan film Polaroid ukuran 57 dengan filter merah.

Pengambilan data fenotip

Data fenotip utama yang dikoleksi pada penelitian ini adalah berat badan (berat lahir; berat awal), berat pada hari ke-90 (dan berat pada hari ke-150 dan ke-210 untuk sapi Bali), sedangkan data fenotip pendukung adalah jenis kelamin, umur dan *breed*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis PCR

Lima puluh sampel dari masing-masing jenis sapi Bali, sapi Madura dan sapi Benggala telah dilakukan PCR untuk mengamplifikasi DNA menggunakan primer GH-1, GH-2, GH-5, dan GH-6. Fragmen yang diamplifikasi dengan primer-primer tersebut adalah dua lokus DNA pada gen hormon pertumbuhan. Amplifikasi menggunakan GH-1 dan GH-2 menghasilkan fragmen 223 bp lokus 1 gen hormon pertumbuhan, sedangkan amplifikasi menggunakan GH5 dan GH6 menghasilkan fragmen 329 bp lokus 2 gen hormon pertumbuhan.

Hasil RFLP

Analisis pola pemotongan oleh enzim restriksi terhadap hasil amplifikasi PCR pada lokus 1 dan lokus 2 gen hormon pertumbuhan dilakukan terhadap 3 jenis sapi pedaging lokal Indonesia. Pada semua jenis ditemukan adanya polimorfisme DNA pada kedua lokus gen hormon pertumbuhan. Polimorfisme yang dideteksi dengan melakukan digesti menggunakan enzim restriksi *AluI* terhadap fragmen 223 bp lokus 1, serta dengan digesti menggunakan enzim restriksi *MspI* terhadap fragmen 329 bp lokus 2 gen hormon pertumbuhan disajikan pada Gambar 2 dan 3.

Situs-situs restriksi yang dihasilkan dari reaksi digesti dengan menggunakan enzim

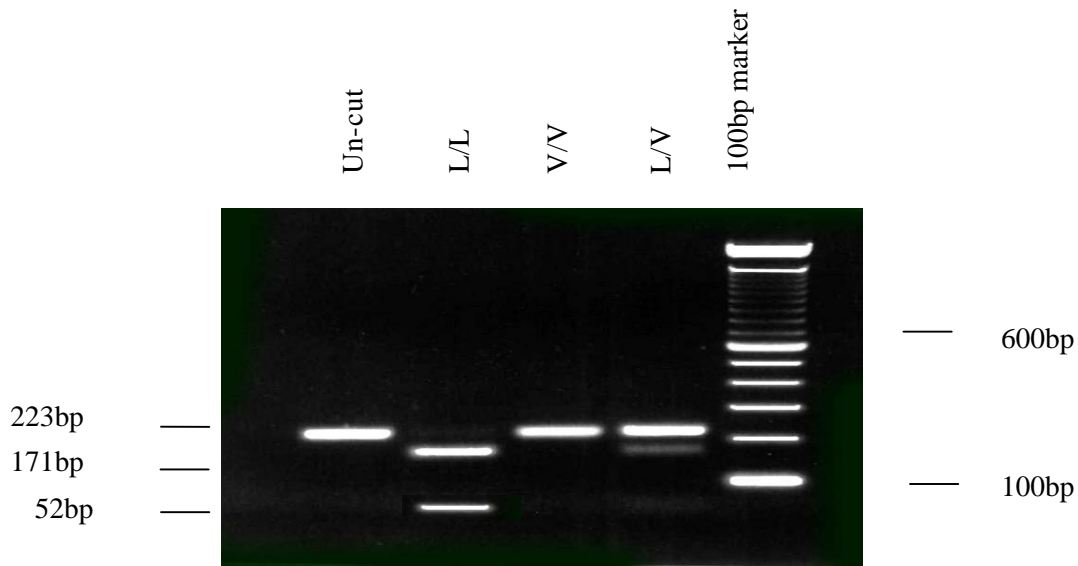
restriksi *AluI* dan *MspI* terhadap lokus 1 dan lokus 2 gen hormon pertumbuhan dipresentasikan pada Table 1.

Tabel 1. Situs restriksi yang dihasilkan dari reaksi digesti dengan menggunakan enzim restriksi *AluI* terhadap fragmen 223 bp lokus 1 gen hormon pertumbuhan, dan *MspI* terhadap fragmen 329 bp lokus 2 gen hormon pertumbuhan.

Enzyme	Allel	Jumlah situs restriksi	Ukuran fragmen (bp)
<i>AluI</i>	L	1	171, 52
	V	0	223
<i>MspI</i>	<i>MspI</i> +	1	224, 105
	<i>MspI</i> -	0	329

Seperti yang diperlihatkan pada hasil di atas, perkembangan-perkembangan yang terjadi pada teknik molekuler telah menghasilkan banyak data tentang variasi genetik dari analisis DNA. Data-data semacam ini akan memberikan pemahaman yang lebih baik pada kita tentang variasi genetik inter dan antar jenis sapi. Analisis dengan PCR-RFLP mampu mendeteksi tipe polimorfisme yang sama seperti yang diperoleh dengan menggunakan teknik RFLP secara tradisional, tanpa melalui Southern Blotting (Cushwa & Medrano, 1996). Karena tanpa Southern Blotting, maka waktu yang diperlukan lebih pendek dan sensitivitasnya pun meningkat (Weber & May, 1989). Jadi metode ini sangat efektif dan efisien untuk mempelajari variasi genetik.

Variasi genetik pada jenis yang sama adalah sangat penting dan riset di bidang ini banyak menarik perhatian pada jenis hewan ternak, karena pengetahuan tentang variasi genetik mempunyai banyak aplikasi pada penylangan dan genetika. Aplikasi variasi genetik ini oleh Archibald (1983) disebutkan misalnya untuk identifikasi hewan dan analisis *pedigree* (silsilah), pemetaan gen dan identifikasi marker/penanda gen yang mengendalikan sifat-sifat yang diinginkan. Karena semua sifat yang tampak (fenotip) dipengaruhi oleh informasi genetik yang dibawa oleh DNA, maka variasi DNA berhubungan dengan terjadinya variasi fenotip. Ide inilah yang merupakan dasar teknik seleksi yang akhir-akhir ini dikembangkan, yaitu seleksi berdasarkan gen marker yang dikenal dengan istilah *marker*



Gambar 2. Fotograf dari gel agarose memperlihatkan adanya polimorfisme DNA pada lokus 1 gen hormon pertumbuhan yang dideteksi dengan menggunakan teknik PCR-RFLP menggunakan enzim *Afl*.



Gambar 3. Fotograf dari gel agarose memperlihatkan adanya polimorfisme DNA pada lokus 2 gen hormon pertumbuhan yang dideteksi dengan menggunakan teknik PCR-RFLP menggunakan enzim *MspI*.

assisted selection (MAS). Teknik seleksi melalui MAS ini telah berkembang sangat cepat pada beberapa tahun terakhir (Schwerin *et al*, 1995; Soller, 1994). Variasi genetik yang diukur langsung pada level DNA, dapat juga digunakan untuk melakukan test terhadap munculnya variasi genetik pada sifat kuantitatif pada suatu jenis. Hal ini sangat bermanfaat dalam menjaga diversitas genetik.

Polimorfisme pada situs restriksi oleh enzim *Afl* dan *MspI* pada lokus 1 dan lokus 2 gen hormon pertumbuhan telah dilaporkan sebelumnya pada sapi penghasil susu (Hoj *et al*, 1993; Lucy *et al*, 1993; Schwerin *et al*, 1995; Soller, 1994), Bavarian Simmental (Schlee *et al*, 1994) dan sapi India (Mitra *et al*, 1995). Analisis menggunakan PCR-RFLP di atas menunjukkan bahwa terjadinya polimor-

fisme pada situs restriksi oleh enzim restriksi *AluI* disebabkan oleh adanya substitusi antara Leusin/Valin pada posisi 127 (Sutarno, 1998). Sedangkan terjadinya polimorfisme pada situs restriksi oleh enzim restriksi *MspI* disebabkan oleh adanya transisi C menjadi T pada posisi +837 (Sutarno, 1998).

KESIMPULAN

Dari hasil-hasil di atas dapat disimpulkan bahwa polimorfisme ditemukan pada sapi Bali dan sapi Benggala, serta pada sapi Madura namun dengan prosentase yang rendah. Perubahan leusin menjadi valin posisi 127 pada lokus 1 gen hormon pertumbuhan yang dideteksi dengan RFLP menggunakan enzim restriksi *AluI*, serta polimorfisme pada lokus 2 yang dideteksi dengan RFLP menggunakan *MspI* ditemukan pada ketiga jenis sapi ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Archibald, A. L. 1983. Genetic variation-the raw material of animal breeding. *ABRO Report* 28-32
- Buis, R. C., J. K. Oldenbroek, and J.H.J. Vanderwerf. 1994. Preserving genetic variance resources in commercial and non-commercial populations. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 42: 29-36
- Cunningham, E.P. 1994. The use of bovine somatotropin in milk production - a review. *Irish Veterinary Journal* 45 (5) 207-210.
- Cushwa, W. T., and J.F. Medrano. 1996. Applications of the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay for Genetic Analysis of Livestock Species. *Animal Biotechnology* 7: 11-31
- Hall, S. J. G., and D.G. Bradley. 1995. Conserving livestock breed biodiversity [Review]. *Trends in Ecology & Evolution* 10: 267-270
- Hammond, K., and H. Leitch. 1995. Towards better management of animal genetic resources. *World Animal Review* 84/85: 48-53
- Hoj, S., M. Fredholm, N.J. Larsen, and V.H. Nielsen. 1993. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Animal Genetics* 24: 91-96
- Kidd, K. K., L. Osterhoff, L. Erhard, and W.H. Stone. 1974. The use of genetic relationships among cattle breeds in the formulation of rational breeding policies: an example with South Devon (South Africa) and Gelbvieh (Germany). *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics* 4: 21-28
- Lucy, M. C., S.D. Hauser, P.J. Eppard, G.G. Krivi, and J.H. Clark. 1993. Variants of somatotropin in cattle - gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domestic Animal Endocrinology* 10: 325-333
- Mitra, A., P.P. Schlee, C.R. Balakrishnan, and F. Pirchner. 1995. Polymorphisms at growth-hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. *Journal of Animal Breeding & Genetics Zeitschrift fur Tierzucht und Zuchtungsbiologie* 112: 71-74
- Schlee, P., R. Gram, L.O. Rottmann, and F. Pirchner. 1994. Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of simmental bulls. *Journal of Animal Breeding & Genetics Zeitschrift fur Tierzucht und Zuchtungsbiologie* 111: 253-256
- Schwerin, M., G. Brockmann, J. Vanselow, and H.M. Seyfert. 1995. Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement. *Archiv fur Tierzucht Archives of Animal Breeding* 38: 21-31
- Soller, M. 1994. Marker assisted selection - an overview. *Animal Biotechnology* 5: 193-207
- Sutarno. 1998. Candidate gene marker for production traits in beef cattle. In *Veterinary Biology*. Perth: Murdoch University.
- Weber, J. L., and P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44: 388-396.